

Process for preparing beta-D-mannuronic acid oligosaccharide monoclonal antibody

Publication number: CN1401786

Publication date: 2003-03-12

Inventor: GENG MEIYU (CN); XIN XIANLIANG (CN); GUAN HUASHI (CN)

Applicant: QINGDAO OCEANOGRAPHY UNIV (CN)

Classification:

- international: **C12P21/08; C12P21/08; (IPC1-7): C12P21/08**

- european:

Application number: CN20011035114 20011115

Priority number(s): CN20011035114 20011115

Report a data error here

Abstract of **CN1401786**

A process for preparing beta-D-mannuronate oligose monoclonal antibody includes chemically linking beta-D mannuronate oligose with bovine serum albumin, immunizing mouse, taking its spleen cells and myeloma cells, fusing them, selective culture, diluting, cloning, choosing positive cloned strain, amplifying a lot of it, in-vitro cell culture, and separating.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
C12P 21/08



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01135114.4

[43] 公开日 2003 年 3 月 12 日

[11] 公开号 CN 1401786A

[22] 申请日 2001.11.15 [21] 申请号 01135114.4

[71] 申请人 青岛海洋大学

地址 266003 山东省青岛市鱼山路 5 号

[72] 发明人 耿美玉 辛现良 管华诗

[74] 专利代理机构 青岛海昊专利事务所

代理人 崔清晨

权利要求书 1 页 说明书 2 页

[54] 发明名称 β -D-甘露糖醛酸寡糖单克隆抗体的制备方法

[57] 摘要

一种 β -D-甘露糖醛酸寡糖单克隆抗体的制备方法,其特征是将 β -D-甘露糖醛酸寡糖与牛血清白蛋白化学连接,免疫小鼠,取该小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合,进行选择培养,经稀释进行克隆化,选择阳性克隆株,并大量扩增,注入同系小鼠腹腔诱生腹水或通过体外细胞培养,分离获得 β -D-甘露糖醛酸寡糖单克隆抗体。它可用于 β -D-甘露糖醛酸寡糖的检测、测定、质量标准、纯化以及阻断 β -D-甘露糖醛酸寡糖的生物效应,使用方便。

ISSN 1008-4274

- 1、 一种 β -D-甘露糖醛酸寡糖单克隆抗体的制备方法,其特征是将 β -D-甘露糖醛酸寡糖与牛血清白蛋白化学连接,制出免疫复合物,免疫小鼠,取该小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合,以选择性培养基进行选择培养,经稀释进行克隆化,选择阳性克隆株,并大量扩增,注入同系小鼠腹腔诱生腹水或通过体外细胞培养,分离。
- 2、 如权利要求1所述的制备方法,其特征是所述的 β -D-甘露糖醛酸寡糖与牛血清白蛋白化学连接是在醋酸钠盐缓冲液中并加入过碘酸钠水溶液的条件下进行的。
- 3、 如权利要求1所述的制备方法,其特征是所述的免疫小鼠是将牛血清白蛋白- β -D-甘露糖醛酸寡糖免疫复合物溶解于生理盐水并与完全弗氏佐剂(CFA)混合对小鼠作背部皮下多点注射。

β -D-甘露糖醛酸寡糖单克隆抗体的制备方法

本发明涉及一种 β -D-甘露糖醛酸寡糖，特别是涉及一种 β -D-甘露糖醛酸寡糖单克隆抗体的制备方法。

β -D-甘露糖醛酸寡糖(HSH-971)是从海藻中分离提取得到的一种低分子量酸性寡糖类物质，其重均分子量为2000道尔顿。发明人在研制该糖类物质的多年实践中认识到，其结构复杂，没有特征性紫外吸收光谱，缺乏特定标准化定量检测方法。因而在HSH-971的检测、测定、质量标准、免疫纯化以及阻断HSH-971的生物效应等诸多方面都存在困难。

本发明的目的是提供一种 β -D-甘露糖醛酸寡糖单克隆抗体的制备方法，它制备出的单克隆抗体能解决现有技术中的上述困难。

一种 β -D-甘露糖醛酸寡糖单克隆抗体的制备方法，其特征是将 β -D-甘露糖醛酸寡糖与牛血清白蛋白化学连接，制出免疫复合物，免疫小鼠，取该小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合，以选择性培养基进行选择培养，经稀释进行克隆化，选择阳性克隆株，并大量扩增，注入同系小鼠腹腔诱生腹水或通过体外细胞培养，分离获得 β -D-甘露糖醛酸寡糖单克隆抗体。

本发明制备的 β -D-甘露糖醛酸寡糖单克隆抗体可用于 β -D-甘露糖醛酸寡糖的检测、测定、质量标准、纯化以及阻断 β -D-甘露糖醛酸寡糖的生物效应，使用方便。

下面通过实施例说明本发明。

将450 mg HSH-971溶解于0.4 ml pH为4的醋酸钠盐缓冲液中，加入2.4%（重量百分浓度）的过碘酸钠水溶液，振荡30 min，加入3 ml 5%（体积百分浓度）的乙二醇水溶液，4℃下放置30 min，用上述醋酸缓冲液透析过夜；加入20 ml含有270 mg牛血清白蛋白（BSA）的碳酸钠盐缓冲液，4℃下透析过夜；再加入40 ml含300 mg 硼氢化钠（ NaBH_4 ）的水溶液，4℃下放置30 min。至此完成了化学连接。将所得反应液浓缩至5 ml，用分离柱Sephadex G-100分离，加入pH为7.4的磷酸缓冲液洗脱，制得BSA-HSH-971免疫复合物。

将4 mg BSA-HSH-971免疫复合物溶解于5 ml生理盐水，与完全弗氏佐剂（CFA）1:1（体积比）混合；取8周龄雌性Balb/c小鼠，作背部皮下多点注射完全弗氏佐剂与BSA-HSH-971混合物0.5 ml；一周后再腹腔注射CFA与BSA-HSH-971混合物0.5 ml，加强免疫，每周加强免疫一次；第4周末时取血检测抗体效价，用生理盐水将血清按1:10000稀释后，进行酶联免疫吸附试验（ELISA）检测，以显色阳性为标准；细胞融合前三天，静脉注射0.25 ml上述BSA-HSH-971免疫复合物。

处死小鼠，制备单个脾细胞悬液，在 50 ml 离心管中混合 10^8 个脾细胞和 10^7 个对数期生长的小鼠骨髓瘤细胞(NS-1 细胞)，并加入 30 ml 单纯培养基，室温 800 转/分钟离心 8 分钟，去上清液，把离心管放于 37℃ 水浴中，缓慢加入 0.8 ml 50%（重量百分比）聚乙二醇-4000，2 分钟加入完毕，边加入边摇离心管，然后缓慢加入单纯培养基，3 分钟内共加入 4 ml，室温 800 转/分钟离心 8 分钟，去上清液；加入 45 ml 20%（体积百分比）小牛血清的 HAT（次黄嘌呤（H）、氨基蝶呤（A）、胸腺嘧啶核苷（T），浓度分别为 H: 1×10^{-6} mol/L, A: 4×10^{-9} mol/L, T: 1.6×10^{-7} mol/L）选择性培养基，吹打后接种于 3 块 96 孔板中，在空气中含有 5%（体积百分比）CO₂ 和 37℃ 的条件下培养，7 天后将培养板中的培养液加满，10 天后观察，用 ELISA 法检测杂交细胞培养液的抗体效价。对效价比较好的杂交细胞进行增殖、传代，并逐渐换用 HT(浓度分别为 H: 10^{-6} mol/L, T: 1.6×10^{-7} mol/L)培养基，直至 20%（体积百分比）小牛血清的培养基。

取出抗体阳性孔细胞，用 HT 培养基将该细胞稀释成 1 个细胞/ml，接种到已接种脾细胞的 96 孔板中，每孔 0.1 ml，使细胞含量为 2 个/孔、1 个/孔或 0 个/孔。在空气中含有 5%（体积百分比）CO₂ 和 37℃ 的条件下培养。显微镜下观察，选出只有一个集落生长的孔，并大量扩增，检测培养上清中的抗体。对抗体阳性孔细胞，大量扩增，得到克隆株三株。

取 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠，每只小鼠腹腔注射 0.5 ml 降植烷，一周后接种杂交瘤细胞 10^6 /只，7-10 天后收集腹水，12000 转/分钟离心 30 分钟，收集上清液，加入 1/10000（重量百分比）NaN₃（叠氮钠）水溶液，-20℃ 下保存。以 Sepharose CL-4B Protein A 柱（Immunopure (A) IgG Purification Kit）分离制得本发明的 HSH-971 单克隆抗体。

经过分析，本发明的单克隆抗体与 HSH-971 的亲合力常数为 $5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-9}$ ，与肝素、乙酰肝素、硫酸皮肤素、硫酸软骨素、透明质酸等人体内多糖和褐藻酸等结构类似的多糖均无交叉反应。经 8 个月连续传代，冻存一年，复苏两次，该单克隆抗体的分泌能力无明显变化；该抗体在 37℃ 保存一周，效价无明显变化；该抗体亚类分别为 IgG1（κ）、IgG2a（κ），染色体条数为 92-96 条。该抗体可用于 HSH-971 的检测、测定、质量标准、纯化，以及阻断 HSH-971 的生物效应。

本实施例中从小鼠腹腔诱生腹水的步骤亦可改用体外细胞培养，具体方法是将克隆株细胞以含 15% 小牛血清的培养基培养，收集培养上清液，以 Sepharose CL-4B Protein A 柱（Immunopure (A) IgG Purification Kit）分离制备本发明的 HSH-971 单克隆抗体。